

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1935-1936. — N° 65

DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE
DANS LES
**ANÉMIES EXPÉRIMENTALES
ET CLINIQUES**

Travail du Laboratoire de Biologie de l'Hôpital Saint-André

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le vendredi 20 décembre 1935

PAR

Jean-Joseph-Émile FERVILLE

Élève du Service de Santé de la Marine

Né à ROCHEFORT (Charente-Inférieure), le 18 janvier 1910.

Examineurs de la Thèse	{	MM. MAURIAC, professeur.....	Président.
		CARLES, professeur.....	Juges.
		DAMADE, agrégé.....	
		DELMAS-MARSALET, agrégé.....	

BORDEAUX
IMPRIMERIE-LIBRAIRIE DELMAS
6, Place Saint-Christoly

1935



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1935-1936. — N° 65

DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE
DANS LES
ANÉMIES EXPÉRIMENTALES
ET CLINIQUES

Travail du Laboratoire de Biologie de l'Hôpital Saint-André

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le vendredi 20 décembre 1935

PAR

Jean-Joseph-Émile FERVILLE

Élève du Service de Santé de la Marine

Né à ROCHEFORT (Charente-Inférieure), le 18 janvier 1910.

Examineurs de la Thèse	{	MM. MAURIAC, professeur.....	Président.
		CARLES, professeur.....	Juges.
		DAMADE, agrégé.....	
		DELMAS-MARSALET, agrégé....	

BORDEAUX

IMPRIMERIE-LIBRAIRIE DELMAS

6, Place Saint-Christoly

1935

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYEN : M. MAURIAC.

ASSESSEUR : M. LABAT.

DOYEN HONORAIRE : M. C. SIGALAS.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. POUSSON, MOURE, RIVIÈRE, BARTHE, DENIGÈS, BEILLE,
CASSAËT, CHAVANNAZ, PACHON

PROFESSEURS

MM.	MM.
Clinique médicale, MAURIAC.	Zoologie et parasitologie MANDOUL.
id. DUPÉRIÉ.	Médecine expérimentale AUBERTIN.
Clinique chirurgicale. BÉGOUIN.	Clinique ophtalmologique TEULIÈRES.
Clinique chirurgicale et gynécologique. GUYOT.	Clinique chirurq. infantile et orthopédie. ROCHER.
Pathologie et thérapeutique générales. CARLES.	Clinique méd. des maladies des enfants. CRUCHET.
Clinique d'accouchements ANDÉRODIAS.	Chimie biologique et médicale. DELAUNAY.
Anatomie pathol. et microscopie clinique. SABRAZÈS.	Physique médicale et pharmaceutique. C. SIGALAS.
Anatomie. VILLEMIN.	Médec. co oniale et clin. des mal. exotiques. BONNIN.
Anatomie générale et histologie G. DUBREUIL.	Clinique des malad. cutanées et syphilitiques. PETGES.
Hygiène. LEURET.	Clinique des maladies des voies urinaires. DUVERGEY.
Médecine légale et déontologie. LANDE.	Clinique des malad. nerveuses et mentales. ABADIE.
Electroradiologie et lin. d'électricité médic. RÉCHOU.	Clinique d'oto-rhino-laryngologie. PORTMANN.
Chimie. CHELLE.	Toxicologie et hygiène appliquée. LABAT.
Botanique et matière médicale. GOLSE.	Hydrologie thérapeutique et climatologie. CREYX.
Pharmacie DUPOUY.	Clinique dentaire N.

MM. LACOSTE (Histologie). PERY (Obstétrique). PERRENS (Maladies mentales). PAPIN (Chirurgie générale).
R. SIGALAS (Parasitologie et sciences naturelles). JEANNENEY (Chirurgie générale).

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

MM.	MM.
Anatomie DUBECQ.	Chirurgie générale. CHARRIER.
id. DUFOUR.	id. LOUBAT.
Physiologie. FABRE.	Obstétrique. RIVIÈRE.
Médecine générale. DAMADE.	Ophtalmologie. BEAUVIEUX.
id. PIÉCHAUD.	Oto-rhino-laryngologie. DESPONS.
id. DELMAS-MARSALET.	Dermatologie et syphiligraphie. JOULIA.
id. DE GRAILLY.	Physique médicale WANGERMEZ.
id. FONTAN.	Chimie générale pharmaceut. et toxicologie. VITTE.

COURS COMPLÉMENTAIRES

MM.	MM.
Physiologie. FABRE.	Zoologie et parasitologie R. SIGALAS.
Médecine opératoire. PAPIN.	Physique médicale et pharmaceutique. WANGERMEZ.
Accouchements. RIVIÈRE.	Botanique. GIRARD.
Pathologie médicale. DELMAS-MARSALET.	Médecine légale. DERVILLÉE.
Puériculture. FAUGÈRE.	Bactériologie. MOUREAU.
Pharmacie chimique. VITTE.	

Ophtalmologie. MM. CABANNES (en congé).

Orthopédie chez l'adulte, pour les accidentés du travail, les mutilés de guerre et les infirmes. N.

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.



A LA MEMOIRE DE MES PARENTS

A MA FEMME

A MES GRANDS-PARENTS

A MON ONCLE ET TUTEUR

MONSIEUR LE DOCTEUR GAUD

*Médecin lieutenant-colonel des Troupes métropolitaines
Officier de la Légion d'honneur.*

A MES FRÈRE ET SŒURS

A TOUS LES MIENS

A MES MAITRES DE LA FACULTE
ET DE L'ECOLE PRINCIPALE DU SERVICE DE SANTE
DE LA MARINE ET DES TROUPES COLONIALES

A TOUS MES CAMARADES

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ DAMADE

*Chef du Laboratoire de Biologie de l'Hôpital Saint-André,
Médecin des Hôpitaux,
Croix de guerre,
Officier d'Académie.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR SERVANTIE

*Docteur en pharmacie,
Chef adjoint du Laboratoire de Biologie de l'Hôpital Saint-André,
Croix de guerre.*

A MONSIEUR LE MÉDECIN GÉNÉRAL CAZAMIAN

*Directeur de l'Ecole principale du Service de Santé
de la Marine et des Troupes coloniales,
Officier de la Légion d'honneur,
Officier de l'Instruction publique.*

A MONSIEUR LE MÉDECIN EN CHEF BRUN

*Sous-Directeur de l'Ecole principale du Service de Santé
de la Marine et des Troupes coloniales,
Officier de la Légion d'honneur,
Décoré de la Croix de guerre,
Officier de l'Instruction publique.*

A MON PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR PIERRE MAURIAC

*Doyen de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux,
Professeur de Clinique médicale,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Croix de guerre,
Officier de l'Instruction publique.*

AVANT-PROPOS

Nous voulons exprimer notre reconnaissance à tous ceux qui ont bien voulu nous aider dans la réalisation de ce travail.

M. le Professeur agrégé Damade nous a fait l'honneur de nous confier l'exécution de la première partie d'une série de travaux qui ont été entrepris sous sa haute compétence dans le laboratoire de biologie de l'Hôpital Saint-André.

M. le Docteur Servantie nous a guidé sans relâche, nous donnant les références et les conseils qui nous ont permis de réaliser cet ouvrage. Nous ne saurions trop les en remercier, ainsi que la sœur du laboratoire.

Nous sommes également reconnaissant à M. le Professeur Mauriac de l'honneur qu'il a bien voulu nous faire en acceptant de présider cette thèse.

Qu'il reçoive ici l'expression de notre gratitude et de notre admiration.

DOSAGE DE L'HÉMOGLOBINE
DANS LES
ANÉMIES EXPÉRIMENTALES
ET CLINIQUES

INTRODUCTION

A l'heure actuelle les possibilités thérapeutiques rendent nécessaires une classification impeccable des anémies en hypochromes et hyperchromes. Du résultat fourni par le dosage de l'hémoglobine découlera un traitement soit par le fer, soit par les extraits hépatiques ou gastriques. Ces derniers depuis les travaux de Whipple et de Castle ont permis d'obtenir de véritables résurrections, mais combien d'observations où ces extraits n'ont donné aucun résultat, alors qu'une médication énergique au fer, basée sur une valeur globulaire exactement déterminée, aurait pu amener l'amélioration cherchée.

Est-il donc si difficile de bien doser l'hémoglobine ?

A voir le nombre de méthodes proposées et les travaux incessants qui paraissent sur ce sujet, il semble que l'accord ne soit pas complet ni sur le taux exact de l'hémoglobine normale, ni sur les méthodes à choisir de préférence.

Nous aurions donc à éclaircir d'abord nos connaissances sur ce point, mais ce qui complique encore la question ce sont les divergences constatées entre les méthodes considérées

valables pour des sangs normaux quand on les utilise comparativement pour des sangs anémiques.

Wu a signalé en 1922 les anomalies du dosage de l'hémoglobine en solution d'hématine acide, anomalies qui disparaissent quand on opère en solution alcaline. Bicart en 1929 a montré que dans les anémies expérimentales la méthode de Haldane qui dose l'hémoglobine en déterminant la capacité respiratoire maxima par le ferricyanure présentait de telles divergences avec les autres méthodes gazométriques, qu'il était évident que le ferricyanure ne dégagait pas la totalité de l'hémoglobine anémique. Le 2 décembre 1931, à la Société française d'hématologie, MM. Fontès et Thivolle ont exposé leurs recherches sur le dosage de l'hémoglobine par trois méthodes (fer-Sahli-macrométhode de Nicloux à l'oxyde de carbone) dans des anémies expérimentales sur le chien et 3 cas d'anémies cliniques. Leurs conclusions furent les suivantes :

1° l'hémoglobine de l'anémie humaine spontanée et grave (3 cas) et l'hémoglobine du chien anémié à des degrés divers (21 cas) se comportent du point de vue du rapport du fer à la capacité respiratoire maxima déterminée par CO, exactement comme l'hémoglobine normale.

Il paraît donc légitime de doser par le fer ou par la capacité respiratoire l'hémoglobine anémique aussi bien que l'hémoglobine normale.

On aura ainsi un dosage d'une très grande précision (au maximum moins de 5 % d'erreur et en moyenne 1,5 à 2,5 % dans tous les cas) et qui, pour le fer, demandera seulement 1 ou 2 cm³ de sang.

2° Le dosage de l'hémoglobine par l'appareil de Sahli comporte des erreurs variables mais considérables qui peuvent atteindre + 45 % pour le sang normal (erreur moyenne de + 12 %) et + 120 % pour le sang anémique (erreur moyenne de — 10 à + 20 %).

Dans la discussion qui suivit, M. Chevallier dit ceci : « les chiffres d'erreur que donnent MM. Fontès et Thivolle pour

l'appareil de Sahli me paraissent considérables. Sans doute nous savons tous que l'appareil de Sahli ne donne que des résultats très approximatifs et qu'il importe de ne pas s'illusionner sur sa précision en exprimant artificiellement ces résultats en poids d'hémoglobine. Il est de connaissance courante que l'appareil de Sahli exige une grande habitude et que les résultats en sont d'autant meilleurs que l'observateur fait plus habituellement des mesures. Les taux énormes d'erreur trouvés par MM. Fontès et Thivolle sont obtenus en comparant les résultats du Sahli à ceux du dosage chimique du fer.

» Ce dosage est fait par une microméthode. La moindre erreur de technique risque d'être multipliée par un nombre énorme, il est donc certain que cette méthode restera réservée aux chimistes spécialisés. »

M. N. Fiessinger partage le même avis que M. Chevallier sur la technique de Sahli.

Nous avons pris comme base de notre travail la discussion soulevée par les conclusions de MM. Fontès et Thivolle et nous avons, au cours de recherches sur les anémies expérimentales chez le lapin, dosé systématiquement l'hémoglobine par deux méthodes : une chimique par le dosage du fer, l'autre colorimétrique par l'hématine acide en utilisant les perfectionnements du colorimètre de Hellige. Nous avons effectué aussi un certain nombre de dosages comparatifs dans les anémies humaines.

Notre travail se divise en quatre chapitres :

Chapitre I : Les méthodes de dosage de l'hémoglobine, historique et résumés.

Chapitre II : Nos méthodes expérimentales : méthode de Sahli; méthode de Hellige; méthode de Wong; méthode de de Fleury et Marque.

Chapitre III : Nos expériences.

Chapitre IV : Nos conclusions.

CHAPITRE PREMIER

METHODES DE DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE

L'hémoglobine est une substance capable :

- 1° de fixer 100 fois plus d'oxygène qu'il ne peut en être dissous dans le plasma;
- 2° de donner aux tissus autant d'oxygène qu'ils en ont besoin pendant le passage dans les capillaires.

Elle se trouve seulement dans les hématies.

Elle contient un chromogène caractérisé par le fer sous forme de sel ferreux, celui-ci peut fixer autant de molécules de gaz qu'il contient d'atomes de fer.

L'hémoglobine peut donner des combinaisons réversibles avec des gaz comme l'oxygène, l'oxyde de carbone.

On peut donc prévoir des possibilités de dosage de l'hémoglobine :

- par la coloration directe ou indirecte du chromogène;
- par le dosage du fer;
- par le dosage du gaz combiné.

Quelle est la valeur normale de l'hémoglobine ?

C'est un point capital sur lequel les auteurs sont loin d'être d'accord. Chez l'homme normal, les documents existants donnent des chiffres différents.

Pour Fabre, la quantité d'hémoglobine est de 13 g. 5 p. 100;

Pour Haldane, elle est de 13 g. 8 p. 100;

Pour Haden, elle est de 15 g. 6 p. 100;

Pour Williamson, elle est de 16 g. 9 p. 100.

Une entente serait désirable.

Néanmoins, il semble que le chiffre de Haden soit le plus près de la vérité.

Il existe également des variations en rapport avec certains facteurs.

1° *Le sexe.* — Il influe sur le taux d'hémoglobine, et Osgood, Wintrobe, Haden, donnent des chiffres différents pour l'homme et pour la femme :

Osgood : homme, 16; femme, 13,60;

Wintrobe : homme, 17; femme, 13,70;

Haden : homme, 13,34; femme, 13,37.

2° *L'âge.* — A un jour, le taux de l'hémoglobine est de 23 g. p. 100.

A un an, il est de 13 grammes.

A trois ans, il est de 12 grammes, il remonte ensuite jusqu'à 15 grammes, pour y rester jusqu'à 60 ans; à partir de ce moment, il commence à décroître.

3° *Variations journalières.* — Rabinovitch donne des taux allant de 97 p. 100 à 71 p. 100, soit donc une variation de 26 p. 100 chez un patient dans la même journée. Il faut tenir compte des repas, qui peuvent influencer dans une certaine mesure le taux de l'hémoglobine.

Mais le doute vient aussi de ce qu'il n'y ait pas un étalon international.

On trouve trois unités différentes dans la littérature. L'hémoglobine est exprimée :

tantôt en grammes d'hémoglobine;

tantôt en capacité en oxygène;

tantôt en pourcentage par rapport à un étalon fixé arbitrairement.

Or, cet étalon est variable suivant la base. Le même sang normal, si on en prend pour 100, le chiffre de Haden, 13,6, sera 20 p. 100 trop faible pour le pourcentage pris par Williamson, 20 p. 100 trop fort pour celui pris par Haldane.

Il faut donc prendre comme unité le gramme d'hémoglobine.

Il peut être fourni :

1° Par la capacité en oxygène ou en oxyde de carbone en appliquant le facteur de Hüfner : 1 gramme d'hémoglobine saturé d'O ou de CO peut libérer 1 cm³ 34 de gaz;

2° Par le dosage du fer : 1 gramme d'hémoglobine correspond à 0,0034 g. de fer.

Historique et classification des méthodes.

En 1820, Le Cann, Prévost et Dumas ont dosé le fer du sang (Murphy, Lynch, Howard, *Arch. int. med.*, 47, 885, 1934).

En 1878, Gowers utilise une méthode colorimétrique par dilution simple du sang et prépare un étalon artificiel de gélatine colorée au picocarmin.

A l'heure actuelle, on peut classer les méthodes de la manière suivante :

- méthodes spectrométriques;
- méthodes gazométriques;
- méthodes chimiques;
- méthodes colorimétriques.

1° Les méthodes spectrométriques.

Le dosage spectrométrique de l'hémoglobine dans le sang a l'avantage sur les procédés colorimétriques de porter sur du sang pur, non dilué, et d'éliminer dans une certaine mesure le coefficient personnel de vision des couleurs. Il est plus exact pour un observateur exercé, mais il demande un certain apprentissage; il a l'inconvénient d'exiger une quantité de sang un peu plus considérable. Il existe pour ce dosage plusieurs méthodes reposant sur deux principes différents :

Le premier, sur lequel sont basées les méthodes généralement employées, est que toute dissolution de sang dans

l'eau, qui exerce sur le spectre un pouvoir absorbant équivalent à celui d'une solution déterminée d'oxyhémoglobine, contient une quantité égale de cette substance. Ces méthodes ont le sérieux inconvénient de réclamer l'usage d'une solution fixe et connue d'oxyhémoglobine; or, cette substance a le désavantage de s'altérer très facilement, ce qui rend ces procédés difficilement utilisables.

Le seconde procédé a été préconisé par Hénocque.

Le sang pur normal, lorsqu'il est sous une épaisseur de $70\ \mu$, donne un spectre de l'oxyhémoglobine dans lequel les deux bandes caractéristiques de cette substance sont égales en largeur et en intensité.

Sous une épaisseur plus considérable ou plus petite, les deux bandes cessent d'être sensiblement égales, soit en largeur, soit en intensité.

Ce qu'Hénocque appelle le phénomène des deux bandes égales coïnciderait donc sous une épaisseur de $70\ \mu$ avec la présence d'une quantité fixe (13 p. 100) d'oxyhémoglobine dans le sang. Plus l'épaisseur de sang nécessaire pour obtenir le phénomène des deux bandes égales sera grande, moins le sang examiné sera riche en oxyhémoglobine. C'est la base du principe du dosage à l'aide de l'hématoscope de Hénocque, appareil fréquemment employé. Nous avons également à notre disposition le spectrophotomètre de Williamson, appareil modernisé où les lectures sont faites à l'aide d'une cellule photoélectrique dont la déviation de l'aiguille indique l'épaisseur de la bande d'absorption.

2° Les méthodes gazométriques.

a) *Méthode de Van Slyke*. — L'appareil permet de dégager et de mesurer gazométriquement tous les gaz du sang. On peut opérer sur CO ou O. Pour obtenir l'oxyde de carbone on traite le sang par l'acide sulfurique concentré, pour obtenir l'oxygène, on le traite par le ferricyanure de potassium. Le vide réalisé à l'aide de la pompe à mercure dégage complètement l'un et l'autre de ces gaz.

On emprisonne le sang dans une ampoule latérale et on fait la lecture. Lorsqu'on opère sur l'oxyde de carbone, on a l'avantage de n'utiliser que 1 cm³ de sang, tandis qu'avec l'oxygène il faut une quantité plus grande.

b) *Méthode de Haldane*. — Elle consiste à faire deux dosages successifs : l'un de l'oxygène absorbable par le sang, l'autre de l'oxygène dégagé.

Dans un premier temps, on hémolyse le sang par la saponine et on agite au contact de l'air. L'oxygène est absorbé. On remet le niveau de la burette au zéro de l'échelle.

Dans le second temps, on ajoute au mélange le ferricyanure de potassium; l'oxygène se dégage. La différence de niveau sur l'échelle donne le résultat.

c) *Méthode de Nicloux*. — On sature le sang par l'oxyde de carbone. L'hémoglobine donne de la carboxyhémoglobine. On traite le sang par l'acide phosphorique et on fait le vide dans l'appareil. L'oxyde de carbone se dégage; on fait arriver de l'eau dans l'ampoule, dans la partie supérieure on a de l'oxyde de carbone gazeux. On fait passer cet oxyde de carbone dans l'eudiomètre où se trouve de l'oxygène. L'oxyde de carbone se transforme alors en gaz carbonique. On le fait absorber par de la potasse, la différence de volume donne le volume de l'oxyde de carbone.

3° Les méthodes chimiques.

Elles sont nombreuses, et les différenciations qui existent entre elles viennent du mode de destruction de la matière organique. Elles procèdent soit par incinération, soit par destruction en milieu humide acide.

a) *Les méthodes de Fleury et Marque, de Fontès et Thivolle* consistent à incinérer la matière organique, les cendres sont dissoutes dans l'acide chlorhydrique concentré. La solution ferrique est réduite à l'état ferreux par le mercure et titrée au permanganate.

b) *Méthode de Lapicque*. — Le sang est également incinéré,

mais on termine la destruction en s'aidant de l'acide sulfurique et de l'acide azotique.

c) *Méthode de Denigès*. — Elle repose sur la production d'une coloration jaune intense due à la formation d'un acide chloroferrique par l'action d'une solution chlorhydrique concentrée sur le fer trivalent. Cette coloration est proportionnelle au fer trivalent mis en expérience.

d) *Méthode de Kennedy*. — On fait agir l'acide sulfurique concentré en présence d'acide perchlorique.

e) *Méthode de Zizine*. — On décompose le sang en chauffant en présence d'acide sulfurique et de chlorate de potasse. Le résidu est repris par l'eau et alcalinisé par la soude.

On se débarrasse de l'ammoniaque formée en chauffant. On ajoute le réactif à l'alloxantine et on compare avec l'étalon.

f) *Méthode de Wong*. — Nous nous réservons le soin de la décrire dans notre second chapitre.

4° Les méthodes colorimétriques.

a) COLORATION PROPRE DE L'OXYHÉMOGLOBINE.

Méthode de Tallqvist. — L'hémoglobinomètre de Tallqvist est composé d'une échelle de 10 rectangles, percés au centre d'un orifice arrondi, colorés en rouge de plus en plus intense et numérotés 10, 20, 30, ..., 100; la teinte du rectangle 100 correspond à celle du sang normal, dont la teneur en hémoglobine est précise comme terme de comparaison.

La goutte de sang produite par piqure de la phalange ou du lobule de l'oreille est recueillie sur une bandelette de papier buvard blanc spécial livré avec l'échelle. Dès que la tache a perdu son aspect brillant, on la glisse sous l'échelle colorée en la comparant par les orifices aux différentes teintes; si par exemple elle a la même teinte que le rectangle marqué 60, nous dirons que le sang examiné renferme 60 p. 100 de l'hémoglobine du sang normal.

Méthodes de Gowers, Hayem, Malassez. — Elles reposent sur la dilution du sang. On aspire celui-ci à l'aide d'une pipette et on le dilue soit avec de l'eau ordinaire (Gowers), soit avec de l'eau distillée (Malassez et Hayem). On compare ensuite l'intensité colorante de la dilution à celle d'un étalon approprié. Cette comparaison doit toujours être faite dans les mêmes conditions de lumière. Les résultats sont exprimés suivant les appareils employés selon trois types d'échelles colorimétriques.

Type I (appareil de Hayem) : L'échelle est basée sur la couleur communiquée à 300 mm³ d'eau distillée par un nombre déterminé de globules rouges. Elle a été établie par comparaison avec des dilutions de sang normal dont on connaissait le nombre de globules rouges par millimètre cube. La richesse en hémoglobine est donc exprimée en nombre de globules rouges sains.

Type II (appareil de Gowers) : Dans cette échelle, une solution fixe et connue de sang normal est prise comme point de repère supérieur. Elle donne 100 p. 100. L'eau pure donne 0 p. 100. L'échelle est établie entre ces deux points. Elle indique donc en pourcentage le rapport de la richesse en hémoglobine du sang examiné avec la richesse du sang normal. Un sang ayant 50 p. 100 d'hémoglobine est un sang ayant deux fois moins d'hémoglobine qu'un sang normal.

Type III (appareil Malassez) : Cette échelle est basée sur la richesse du sang en poids absolu d'hémoglobine. On estime que celle-ci est à l'état normal de 14 à 15 p. 100 chez l'homme. Les chiffres sont établis par comparaison avec des dilutions d'hémoglobine de moins en moins fortes. Il en résulte qu'un sang ayant 7,5 p. 100 d'hémoglobine avec l'échelle du type III sera l'équivalent d'un sang ayant 50 p. 100 d'hémoglobine avec l'échelle du type II.

Citons également la *méthode de Hallion et Borrien*, dont l'appareil se compose d'étalons stables allant de 10 p. 100 à 100 p. 100 d'hémoglobine entre lesquels on glisse le tube de la solution à doser.

b) MÉTHODE A LA CARBOXYHÉMOGLOBINE.

C'est la méthode de Palmer. — L'échantillon de sang est mélangé à une solution ammoniacale. On fait passer dans ce mélange le gaz d'éclairage. Il se forme de la carboxyhémoglobine. On n'a plus qu'à comparer la couleur de la solution et celle de l'étalon dans un colorimètre.

c) MÉTHODE A L'HÉMATINE ACIDE.

Méthode de Sahli. — Sahli a voulu éviter l'instabilité et la couleur trop jaune des étalons au picrocarmin. Dans ce but, il transforme l'hémoglobine en chlorhydrate d'hématine, qui a une couleur brun foncé. Pour cela, il mélange le sang à une solution d'acide chlorhydrique. On ajoute ensuite de l'eau pour arriver à égalité de teinte avec l'étalon.

Méthode de Newcomer. — Cette méthode a l'avantage d'utiliser comme étalon une série de plaques de verre, dont la couleur restera toujours la même. Ces verres-étalons sont faits d'une seule pièce et possèdent un pouvoir d'absorption égal à celui de l'hématine acide. Le colorimètre se compose de deux tubes. Dans l'un on place de l'eau et au-devant le verre étalon. Dans l'autre, on met une solution d'acide chlorhydrique à laquelle on ajoute l'échantillon de sang.

La partie inférieure de la colonne de verre est amenée au contact de l'eau du côté de l'étalon. Les couleurs sont égalisées en plongeant le tube de verre dans la solution de sang.

d) MÉTHODE A L'HÉMATINE ALCALINE.

Méthode de Cohen et Smith à l'hématine acide modifiée par Wu en hématine alcaline. — La quantité de sang nécessaire est mélangée à une solution d'acide chlorhydrique au 10°. On place le tube dans l'eau à 35 ou 40 degrés pendant dix minutes, puis on laisse quarante minutes à la température de la pièce. On ajoute au mélange 3 cm³ de la solution d'hydroxyde de sodium à 10 p. 100. On compare dans un colori-

mètre le mélange ainsi préparé avec la solution étalon, à laquelle a été ajoutée au même moment le même volume de la solution d'hydroxyde à 10 p. 100.

e) MÉTHODE A LA CYANHÉMOGLOBINE.

Méthode de Stadie-Wu. — On dilue le sang avec une solution ammoniacale à 4 p. 100. On ajoute du ferricyanure pour changer l'hémoglobine en méthémoglobine. Après vingt minutes, on additionne au mélange une solution de cyanure de potassium qui va former la cyanhémoglobine. On n'aura plus qu'à comparer la couleur de la solution avec celle de l'étalon.

Choix d'une méthode.

Nous nous plaçons avant tout au point de vue clinique. Aussi ne peut-il être question que de méthodes simples donnant des lectures rapides. Les méthodes colorimétriques sont par excellence celles qui répondent à ces conditions; elles ont, en outre, l'avantage de ne demander qu'une petite quantité de sang. Malgré cela, elles ont soulevé de nombreuses critiques, car elles ne donnent pas toujours des résultats fidèles. Les méthodes de coloration de l'oxyhémoglobine (méthodes de Tallqvist, de Hayem, de Gowers, de Malassez, de Hallion et Borrien) sont certainement les plus simples, mais elles donnent souvent des erreurs grossières dues à la mauvaise conservation et à l'altération du liquide de la solution étalon.

Les méthodes à la carboxyhémoglobine ont l'inconvénient d'utiliser un gaz toxique, c'est là une raison pour les éliminer.

Les méthodes à l'hématine acide sont les plus utilisées, mais elles ne sont pas sans avoir été chaudement critiquées. Nous avons vu que Fontès et Thivolle ont apporté la preuve de l'insuffisance de la méthode de Salhi à la Société d'hématologie. Quoi qu'il en soit, elles ont de nombreux parti-

sans. Terrill d'abord, Sahli ensuite, qui les ont introduites, les considèrent comme de bonnes méthodes, qui doivent être retenues à cause de leur simplicité. Newcomer était également un de leurs défenseurs. D'autres auteurs : Cohen et Smith, Robscheit et Sevely, trouvèrent des résultats acceptables à condition que les étalons aient été préparés en même temps.

Berczeller prouva que la couleur obtenue dépendait en partie du plasma. Une suspension donnée de globules rouges de mouton, mélangée à un plasma de mouton différent, donnent des couleurs variant de 10 p. 100 et plus. Wu trouva aussi que la couleur du sang dilué avec l'acide était troublée par les substances non hémoglobiniques contenues à la fois dans le plasma et dans le stroma des globules rouges. Pour cet auteur, l'hémoglobine purifiée dissoute dans le plasma donne une lecture 20 p. 100 plus forte que lorsqu'elle est dissoute dans une solution salée, et les globules rouges, qui avaient été simplement lavés, donnent une lecture plus petite en suspension dans le plasma qu'en suspension dans une solution salée. Ces effets particuliers disparaîtraient quand les solutions de sang seraient alcalinisées avant que les lectures soient faites. Wu attribua les anomalies des solutions acides au fait que dans celles-ci les dérivés de l'hémoglobine formaient une suspension colloïdale plutôt qu'une véritable solution, et la nuance ainsi que l'intensité de la couleur étaient influencées par des facteurs altérant l'état de la dispersion. Nous avons tenu à vérifier les objections de cet auteur lorsqu'il dit qu'une cause d'erreur réside dans l'altération des couleurs du sang par des substances non hémoglobiniques contenues dans le plasma. A plusieurs reprises, nous avons centrifugé le sang provenant d'un anémique que nous avons préalablement fluoré et nous avons remplacé le plasma par une quantité égale de plasma d'un individu normal. Les lectures faites dans les deux cas donnèrent des résultats identiques.

Wu trouva que les meilleures lectures étaient obtenues

avec des solutions alcalines dans lesquelles la présence de la méthémoglobine ne gênait en rien les lectures comme en hématine acide.

Quoique obtenant des résultats corrects avec cette dernière méthode, il préfère encore à celle-ci la cyanhémoglobine, mais un inconvénient non négligeable est l'emploi du cyanure de potassium, qui est un poison violent et demande à être manipulé avec d'innombrables précautions.

Nous voyons que la méthode à l'hématine acide comporte de nombreux inconvénients auxquels nous pouvons remédier en y apportant les modifications que Wu a énoncé dans ses nombreuses critiques.

Cependant nous tenons à la conserver telle qu'elle a été employée par Fontès et Thivolle, car il ne faut pas oublier que nos recherches ont également un but comparatif; nous l'avons déjà dit dans notre introduction.

Il nous reste maintenant à choisir notre méthode de contrôle. La méthode spectrophotométrique ne nous retiendra pas pour les raisons ci-après : en effet, Bicart (thèse de Strasbourg, 1929) a constaté l'existence d'anomalies dans les propriétés optiques des pigments sanguins anémiques. Les coefficients d'extinction de l'oxyhémoglobine mesurés par les sommets des bandes α et β sont plus bas dans les sangs anémiques que dans les sangs normaux. De plus, les coefficients d'absorption sont modifiés. Restent les méthodes gazométriques et chimiques. Les méthodes de Van Slyke et Nicloux demandent non seulement des manipulations impeccables, mais un appareillage de même, que nous n'avons pas à notre disposition dans un laboratoire de clinique.

Quant à la méthode de Haldane, Bicart (thèse de Strasbourg, 1929) la condamne. Dans ses travaux, il a comparé les résultats obtenus avec le ferricyanure de potassium et avec la pompe à mercure. Ces résultats, identiques lorsqu'il s'agit de sangs normaux, deviennent divergents lorsqu'on s'adresse à des sangs anémiques (anémies pathologiques et expérimentales). Il a pu démontrer que dans un grand nombre de

cas l'hémoglobine ne libérait plus la totalité de son oxygène par action du ferricyanure de potassium, pour des raisons qui lui sont d'ailleurs inconnues.

Restent les méthodes chimiques au fer.

Peters, puis Fontès et Thivolle ont montré qu'il existe une relation étroite entre l'oxygène et l'oxyde de carbone d'une part et le fer hémoglobinique d'autre part. Pour une molécule d'oxygène ou d'oxyde de carbone, on trouve toujours un atôme de fer, soit 56 grammes.

A 1 milligramme de fer hémoglobinique correspond donc 0 cm³ 4 d'oxygène ou d'oxyde de carbone. Si N est la quantité de fer en milligrammes renfermée dans un centimètre cube de sang, on voit que la relation

$$N \times 0,4 \times 100 = N \times 40$$

donnera la capacité respiratoire de ce sang.

De cette rapide revue, il résulte que 15 grammes ou 100 p. 100 d'hémoglobine dans 100 cm³ de sang correspondent à 0 mg. 5 de fer par centimètre cube ou à une capacité respiratoire de 20. Il est alors facile de passer du fer à la capacité respiratoire (coefficient 40) et de celle-ci au pourcentage d'hémoglobine (coefficient 5).

Il résulte des travaux de ces auteurs que la méthode au fer peut-être considérée comme une méthode de détermination aussi sûre que les méthodes gazométriques, puisqu'elle s'adresse à un élément fixe de l'hémoglobine. Notons cependant que G. O. Brown et A. P. Briggs (*Journal of laboratory and clinical medecine*, p. 886, t. XXX : Hemoglobine and Blood relation as determinated by iron and oxygen capacity methodes), après de nombreux dosages, considèrent que les résultats trouvés par la méthode au fer sont toujours inférieurs à ceux trouvés par les méthodes gazométriques (voir leurs tableaux).

Cependant cette différence est si minime qu'elle peut être considérée comme négligeable.

Par ailleurs, Haden (*Journal of laboratory and clinical mé-*

decine, p. 406, 1933-1934), après de longues recherches personnelles, montre la concordance des méthodes au fer et gazométriques.

Dans ses travaux, cet auteur a utilisé plusieurs méthodes au fer, et toutes furent aussi fidèles; cependant il nous conseille la méthode de Wong, aussi précise que toutes les autres, beaucoup plus simple, ne demandant qu'une petite quantité de sang, possédant par conséquent les qualités que nous exigeons des méthodes cliniques de dosage de l'hémoglobine. En outre, elle est la seule qui ne demande pas l'incinération ou la destruction de la matière organique.

Cette méthode simple, pratique, déjà contrôlée, est celle que nous avons adoptée comme méthode de base.

En conclusion, le dosage sûr de l'hémoglobine peut être fait aussi bien par les méthodes gazométriques que par les méthodes au fer. La supériorité des méthodes au fer vient de ce qu'elles peuvent doser l'hémoglobine sous toutes ses formes.

CHAPITRE II

NOS METHODES EXPERIMENTALES

Dans le premier chapitre, nous avons passé en revue les différentes variétés de méthodes que nous avons à notre disposition pour doser l'hémoglobine et nous avons tenu à indiquer succinctement quel était le principe de chacune d'elles.

Les unes sont des méthodes fidèles; les autres, au contraire, ne donnent que des résultats approximatifs. Certaines sont des méthodes longues, demandant un appareillage perfectionné; certaines sont des méthodes simples et rapides.

Il nous a fallu dans cette diversité faire notre choix, lequel a dû satisfaire au double but que nous poursuivons, but clinique d'abord, but comparatif ensuite.

Le but clinique nous oblige déjà à éliminer les méthodes longues et compliquées, et nous avons dû, en définitive, nous arrêter aux méthodes colorimétriques et aux méthodes au fer.

Le but comparatif demande que nous gardions la méthode à l'hématine acide, qu'avaient employée Fontès et Thivolle, tout en reconnaissant comme justes les objections des auteurs dont nous avons parlé, Wu en particulier.

Nous avons abandonné l'appareil de Sahli, car il ne peut, à notre avis, donner des lectures précises, surtout lorsqu'il s'agit de sangs anémiques. L'étalon s'altère rapidement sous l'action de la lumière, la solution de chlorhydrate d'hématine n'étant pas stable. D'ailleurs, les différents étalons livrés par le constructeur ne présentent pas exactement la même coloration.

Nous avons profité des modifications apportées par Autenrieth, qui préconise l'emploi d'un étalon stable et d'un

colorimètre plus commode, l'appareil de Hellige. La précision de cet appareil est telle que des observateurs non entraînés, faisant la même lecture, trouvent des résultats identiques.

Nous avons parlé assez longuement de la méthode et de l'appareil de Sahli dans notre premier chapitre; il nous reste maintenant à décrire le principe et la technique de celle d'Autenrieth-Hellige.

Méthode d'Autenrieth-Hellige.

W. Autenrieth et K. Dorner (*Munch. med. Wochenschrift*, 1923, 48, p. 2043-2045) sont arrivés, après des études s'étageant sur plusieurs années, à produire des cristaux d'oxyhémoglobine pure de sang humain. Ce sont ces cristaux qui ont servi à établir l'étalon des prismes qui servent au dosage de l'hémoglobine avec l'appareil de Hellige.

En partant de cet étalon, on pratique les dosages de la manière suivante : on prélève au malade ou à l'animal en expérience une quantité de sang égale à 20 mm³, que l'on aspire jusqu'à la marque inférieure de la pipette fournie avec le prisme, puis on remplit celle-ci d'acide chlorhydrique à N/10, jusqu'à la marque supérieure, soit 2 cm³.

On mélange intimement en secouant la pipette, puis on expulse son contenu dans la petite cuvette du colorimètre et on attend cinq minutes. Après mise au point à égalité de couleur, on lit le résultat en millimètres sur l'échelle du colorimètre et on se reporte sur la table jointe à l'appareil qui indique en grammes le contenu réel d'oxyhémoglobine dans 100 cm³ de sang.

Les chiffres du tableau réfèrent aux résultats des lectures obtenues cinq minutes après mélange dans la pipette.

Si la lecture ne se relève qu'après dix minutes, il faut déduire 2 p. 100 de la valeur trouvée. Pour lecture après deux heures, il faut déduire 8 p. 100.

Pour ces auteurs, la teneur de sang normal en hémoglobine serait de 17 g. p. 100.

Quant à notre méthode de base, nous avons choisi les méthodes chimiques ou ferrométriques.

Fontès et Thivolle ont fait la comparaison entre les méthodes gazométriques, considérées comme base de toutes les méthodes et celles du fer.

Ils concluent à égalité de valeur, de même que Peters et Haden.

Dans leurs travaux, ces auteurs ont utilisé leur méthode, mais ils conseillent celle de Fleury et Marque. Cependant elle est longue, compliquée, à tel point que nous lui avons préféré la méthode de Wong, mais nous avons voulu à titre de comparaison en décrire le principe et la technique avant de passer à celle que nous avons adoptée.

Méthode de Fleury et Marque.

PRINCIPE. — Le sang est incinéré en présence d'une petite quantité de nitrate de magnésium. Les cendres sont dissoutes dans l'acide chlorhydrique concentré. La solution ferrique obtenue est réduite à l'état ferreux par le mercure et titrée au permanganate en présence de réactif phosphomolybdique, qui donne une coloration bleue avec les sels ferreux.

TECHNIQUE. — Réactifs nécessaires :

1° Solution de nitrate de magnésium :

Nitrate de magnésium cristallisé	50 g.
Eau distillée	100 g.

2° Acide chlorhydrique pur officinal ($D = 1,27$).

3° Mercure pur distillé.

4° Réactif phosphomolybdique de Fontès et Thivolle :

Dans un ballon de 1 litre, introduire :

Eau distillée	300 cm ³ .
Acide molybdique	20 g.
Soude pure à l'alcool	40 g.

Faire bouillir jusqu'à départ complet d'ammoniaque, ce qui demande au moins une demi-heure.

Refroidir et ajouter :

Eau	300 à 400 cm ³ .
Acide phosphorique cristallisé	200 g.

Faire bouillir un quart d'heure et ajouter au liquide bouillant 15 grammes de sulfate de manganèse (à 4 H²O) et goutte à goutte une solution concentrée de permanganate jusqu'à coloration rose persistante. Après refroidissement, faire disparaître exactement la couleur par addition d'une solution diluée de sulfate ferreux. Compléter à 1 litre à l'éprouvette avec de l'eau distillée (conservation indéfinie).

5° Solution titrée au quarantième de la solution décinormale.

Si la solution mère est décinormale, 1 cm³ de la dilution au quarantième (N/400) correspond à 0 mg. 440 de fer.

MODE OPÉRATOIRE :

1° *Incinération.* — Dans une capsule à incinération en porcelaine de 60 à 70 millimètres de diamètre, mesurer, ou mieux peser 2 ou 3 cm³ de sang citraté ou fluoré. Y ajouter 0 cm³ 5 de la solution de nitrate de magnésium. Bien mélanger et évaporer à sec au bain-marie en s'efforçant d'étaler le produit en une couche uniforme sur tout le fond de la capsule. Incinérer au moufle au rouge jusqu'à cendres blanches, en surveillant surtout le début pour modérer la déflagration. Quelques débris de charbon ne gênent pas.

2° *Dissolution.* — Après refroidissement, verser sur les cendres, goutte à goutte, en mouillant toute la surface, 1 cm³ d'acide chlorhydrique. La dissolution est immédiate. On termine en promenant l'acide chlorhydrique dans toute la capsule à l'aide d'un agitateur.

A l'aide de 10 cm³ d'eau employés en trois fois, on peut passer la solution dans un petit flacon de 15 cm³ à étroite ouverture et muni d'un bouchon bien ajusté.

3° *Réduction*. — Ajouter 0 cm³ 3 de mercure pur, boucher le flacon avec un bouchon de liège bien ajusté et agiter vigoureusement pendant cinq minutes. Il se produit un précipité blanc de calomel mêlé de mercure émulsionné.

4° *Titrage*. — Filtrer sur un petit filtre sans pli ou mieux sur un filtre de Fontès en recueillant dans 10 cm³ de réactif molybdique placés dans une capsule à fond plat en porcelaine blanche. Laver en deux ou trois fois avec 5 à 7 cm³ d'eau bouillie refroidie. Ajouter la solution de permanganate titrée à l'aide d'une burette de 20 cm³ graduée en dixièmes, jusqu'à décoloration complète. Avec un peu d'habitude, le virage est saisi à 2 ou 3 gouttes près.

CALCUL. — Une opération à blanc fixe la correction, qui d'ordinaire est de 0 cm³ 2 à 0 cm³ 3.

Soit :

p le titre de la solution de permanganate;

n le nombre de centimètres cubes corrigé;

P la prise de sang en grammes.

Fer en milligrammes pour 1.000 grammes de sang sera donné par la formule :

$$\frac{n \times p \times 1.000}{P}$$

La teneur moyenne du sang humain en fer par litre est d'environ 500 milligrammes pour 3 grammes d'un tel sang, on emploierait 10 cm³ 7 de la solution de permanganate à N/400.

Pour transformer ce résultat en hémoglobine, il suffit de multiplier le poids du fer par le facteur 263.

Méthode de Wong.

SUPÉRIORITÉ DE LA MÉTHODE DE WONG. — Elle vient :

a) De sa facilité. Nous n'avons pas ici à pratiquer la destruction de la matière organique. C'est là vraiment un

avantage que nous apprécions d'autant mieux que nous venons d'étudier la méthode de Fleury et Marque.

b) De l'augmentation de l'intensité colorante sur les méthodes habituelles au sulfocyanate. Il se forme un complexe de sulfocyanure de fer et de sulfocyanure de potassium. Par suite de l'excès de sulfocyanure, ce complexe est plus coloré que le sulfocyanure ferrique.

c) De la stabilisation de la couleur, qui permet non seulement de faire des dosages pendant un temps très long après la préparation (2 heures et même 24 heures), mais encore permet d'établir un étalon stable ou d'opérer en colorimétrie absolue.

CONDITIONS A REMPLIR. — Il faut un titrage exact de tous les composants.

1° *L'oxydant*. — L'excès voulu de persulfate de potassium empêche la décoloration du sulfocyanure ferrique par transformation du sulfocyanure ferreux. Il faut éviter un grand excès qui risquerait d'oxyder le sulfocyanure formé.

2° *Action de l'acidité*. — Elle est importante, d'où nécessité d'ajouter à l'étalon la même quantité d'acide.

3° *Action de la quantité ajoutée de sulfocyanure de potassium*. — Il faut un grand excès pour former le complexe, mais cependant la quantité ajoutée doit correspondre à celle donnée par Wong.

INCONVÉNIENTS. — Il faut éviter tous corps pouvant former eux aussi des complexes avec le fer, tels que : fluorures, arsénates, phosphates.

Nous avons cependant vérifié que l'oxalate et le fluorure de sodium ajoutés à la dose juste suffisante pour empêcher la coagulation ne gênaient pas, et que l'on obtenait les mêmes chiffres qu'avec le sang pur.

VÉRIFICATIONS :

a) COMPARAISON AVEC LA CAPACITÉ RESPIRATOIRE. — Nombreux sont les travaux comparant la méthode de Wong et la capacité respiratoire (Haden). Il y a concordance à plus ou moins 2 p. 100 au maximum.

b) *Comparaison avec les autres méthodes au fer.* — Nous avons vu que Haden utilisa plusieurs méthodes au fer; elles furent toutes aussi fidèles.

PRINCIPE ET TECHNIQUE.

PRINCIPE. — Le fer de la molécule d'hémoglobine est détaché par l'action de l'acide sulfurique concentré; la décomposition sera facilitée par la présence du persulfate de potassium. Les protéines sont précipitées par l'acide tungstique et filtrées. Puisque le procédé tout entier se passe sans ébullition, la concentration d'acide peut être contrôlée dans l'inconnu et faite la même que dans l'étalon pour produire la couleur. L'altération de celle-ci sera retardée par addition de persulfate de potassium à la fois à l'inconnu et à l'étalon.

RÉACTIFS :

1° Acide sulfurique concentré.

2° Tungstate de sodium : Solution à 10 p. 100 comme dans la méthode de Folin-Wu pour précipiter les protéines du sang.

3° Persulfate de potassium saturé. Introduire dans un flacon bouché à l'émeri 7 grammes de persulfate de potassium pur et agiter avec 100 cm³ d'eau distillée. La partie non dissoute tombe au fond. Maintenir un excès de persulfate qui remplace automatiquement le sel décomposé.

4° Sulfocyanate de potassium.

Préparer approximativement une solution 3 fois normale en dissolvant 146 grammes de sulfocyanate de potassium pur dans 100 cm³ d'eau distillée; filtrer si cela est nécessaire. Additionner 20 cm³ pour éprouver la qualité.

5° Solution du fer étalon : Peser exactement 0 g. 861 de cristaux de sulfate ferreux d'ammonium et les dissoudre dans 50 cm³ d'eau distillée.

Diluer avec de l'eau distillée jusqu'à un litre. Chaque centimètre cube doit contenir 0 mg. 1 de fer, pour être utilisé comme étalon régulier. On a intérêt à utiliser des étalons faibles; on diluera pour cela cette solution.

MODE OPÉRATOIRE. — Mettre exactement 0 cm³ 5 de sang dans un ballon de 50 cm³, et ajouter 2 cm³ d'acide sulfurique concentré. Tourner rapidement le flacon pour agiter le mélange pendant une à deux minutes. Additionner ensuite 2 cm³ de la solution saturée de persulfate de potassium et agiter. Diluer environ à 25 cm³ avec de l'eau distillée, et mettre 2 cm³ de la solution de tungstate de soude. Mélanger et laisser refroidir à la température de la pièce. Compléter à 50 cm³, fermer le flacon et le renverser deux ou trois fois pour en effectuer le mélange. Filtrer à travers un papier-filtre sec dans un vase sec et propre.

Prélever exactement 20 cm³ du filtrat clair dans un large tube à essai gradué à 20 cm³ et à 25 cm³.

Mesurer dans un autre tube à essai semblable exactement 1 cm³ de la solution étalon contenant 0 mg. 1 de fer pour 1 cm³ et additionner à l'aide d'une pipette graduée 0,8 d'acide sulfurique concentré. Diluer à 20 cm³ avec de l'eau distillée et laisser refroidir.

Ajouter à la fois à l'inconnu et à l'étalon 1 cm³ de persulfate de potassium saturé et 4 cm³ de la solution de sulfocyanate de potassium. Mélanger et comparer dans le colorimètre.

CALCULS. — 20 cm³ du filtrat correspondent à 0 cm³ 2 de sang.

Dans la solution étalon 20 cm³ contiennent 0 mg. 1 de fer.

Nos deux solutions sont mises à la même intensité de couleur dans le colorimètre. Désignons par E la division où se trouve l'étalon et par I la division de l'inconnu.

La quantité de fer en milligrammes contenue dans 100 cm³ de sang sera donnée par l'équation :
$$\frac{E \times 50}{I}$$

Comme l'hémoglobine contient 0 mg. 0335 de fer pour 100,

$$\frac{E \times 50}{I \times 3,35}$$

donnera la quantité d'hémoglobine pour 100 cm³ de sang.

En opérant avec le colorimètre de Helligé et en utilisant un prisme garni avec l'étalon les lectures sont très facilitées.

CHAPITRE III

NOS RESULTATS

Nous nous sommes proposé de doser l'hémoglobine :

- 1° dans les anémies expérimentales;
- 2° dans les anémies cliniques.

La partie expérimentale est la plus importante, et nous avons voulu dans la seconde vérifier si les résultats trouvés étaient identiques chez l'homme et chez le lapin.

Ce chapitre se divise donc en deux parties :

- 1° Recherches dans les anémies expérimentales;
- 2° Recherches dans les anémies cliniques.

I. — *Anémies expérimentales.*

Nous avons opéré sur quatre lapins, que nous avons suivis jusqu'à leur mort. Nous avons pu ainsi dresser des courbes qui nous permettent de suivre les variations du taux de l'hémoglobine par rapport au nombre des globules rouges. Nos animaux en expérience étaient rendus anémiques par des saignées que nous pratiquions d'une façon irrégulière. Notons que pour deux lapins nous leur avons injectés à la fin une solution de phénylhydrazine pour abaisser encore le nombre des globules rouges.

Les dosages ont été faits régulièrement soit tous les jours, soit tous les deux jours.

L'échantillon de sang (3 cm³) était prélevé sur oxalate à l'oreille du lapin; nous faisons aussitôt une numération glo-

bulaire, un dosage de l'hémoglobine par la méthode d'Autenrieth-Hellige et par la méthode de Wong.

Ainsi nous avons pu suivre les variations de la teneur en hémoglobine par rapport au nombre des globules rouges.

Sur les courbes qui suivent chaque tableau, nous avons indiqué :

- la numération globulaire;
- le taux de l'hémoglobine au Hellige;
- le taux de l'hémoglobine au Wong.

On se rapportera aux indications données au bas des courbes pour savoir à quel graphique correspond chacune d'elles.

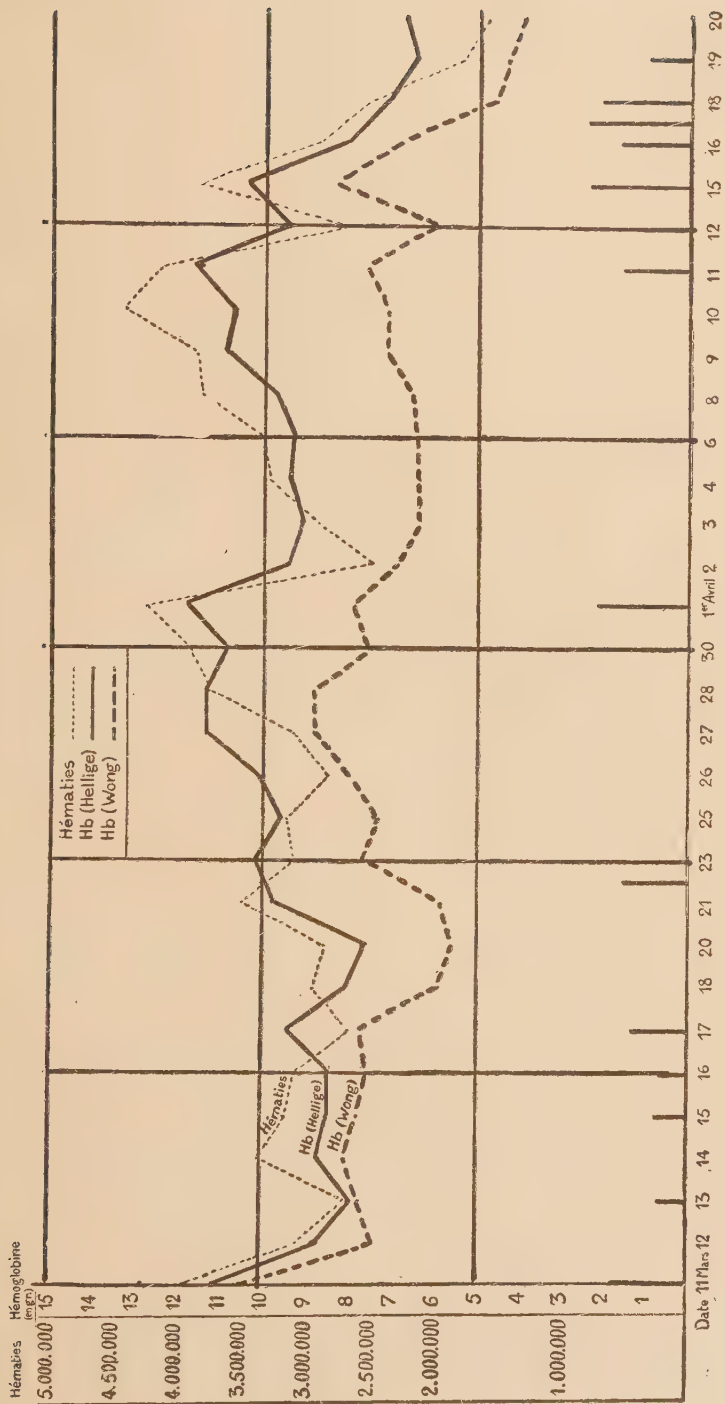
Nous avons également marqué les saignées par des traits verticaux, dont la hauteur est proportionnelle à la quantité de sang retiré.

TABLEAUX ET COURBES DES EXPERIENCES

LAPIN n° 78 (femelle; poids : 4 kg. 110).

	HEMATIES	LEUCO- CYTES	HELLIGE HÉMOGLOBINE en g.	WONG		SAIGNÉE EN cm ³
				FER en mg.	HÉMOGLOBINE en g.	
11 mars.	3.880.000	2.800	11,11		10,5	60
12 mars.	3.100.000	3.600	8,8	25	7,5	
13 mars.	2.680.000	6.000	8	25,90	7,73	15
14 mars.	3.350.000	15.600	8,8	26,73	7,97	
15 mars.	3.200.000	7.600	8,5	25,90	7,73	30
16 mars.	3.100.000	8.000	8,5	25,51	7,61	15
18 mars.	2.640.000	2.400	9,4	25,82	7,70	35
19 mars.	2.900.000	5.200	8,1	19,84	5,93	
20 mars.	2.800.000	7.600	7,7	19,01	5,67	
21 mars.	3.340.000	9.200	9,8	20	5,9	
22 mars.						50
						Injection de 22 cm ³ d'une solution d'hémoglo- bine.
23 mars.	3.120.000	7.200	10,1		7,69	
24 mars.	3.200.000	7.600				
25 mars.	3.280.000	7.600	9,6	25,25	7,5	
26 mars.	2.840.000	5.200	10,1	26,73	7,93	
27 mars.	3.120.000	4.400	11,4	29,41	8,77	
28 mars.	3.740.000	6.200	11,4	29,57	8,82	
30 mars.	3.900.000	8.400	10,9	25	7,5	
1 ^{er} avril.	4.320.000	9.200	11,8	26,73	7,97	65
2 avril.	2.500.000	8.000	9,4	23,36	6,9	
3 avril.	2.980.000	6.000	9,2	21,73	6,48	
4 avril.	3.240.000	10.000	9,4	21,2	6,33	
6 avril.	3.280.000	10.000	9,4	21,4	6,40	
8 avril.	3.850.000	5.600	9,8	21,73	6,48	
9 avril.	3.880.000	6.000	10,9	23,80	7,10	
10 avril.	4.400.000	6.800	10,7	23,80	7,10	
11 avril.	4.080.000		11,6	25,51	7,61	55
12 avril.	2.600.000	10.000	9,6	19,68	5,87	
13 avril.	3.880.000	5.600	10,5	28,25	8,43	
						80
						Injection de 7 cm ³ 5 d'au- to-hémoglo- bine.
16 avril.	2.900.000	16.000	8,1	22,7	6,77	45
17 avril.	2.560.000	7.600				65
18 avril.	1.780.000	7.200	7,2	15,37	4,58	60
19 avril.	1.520.000	12.400	6,5	14,75	4,4	30
20 avril.	1.580.000	10.000	6,8	13,50	4	

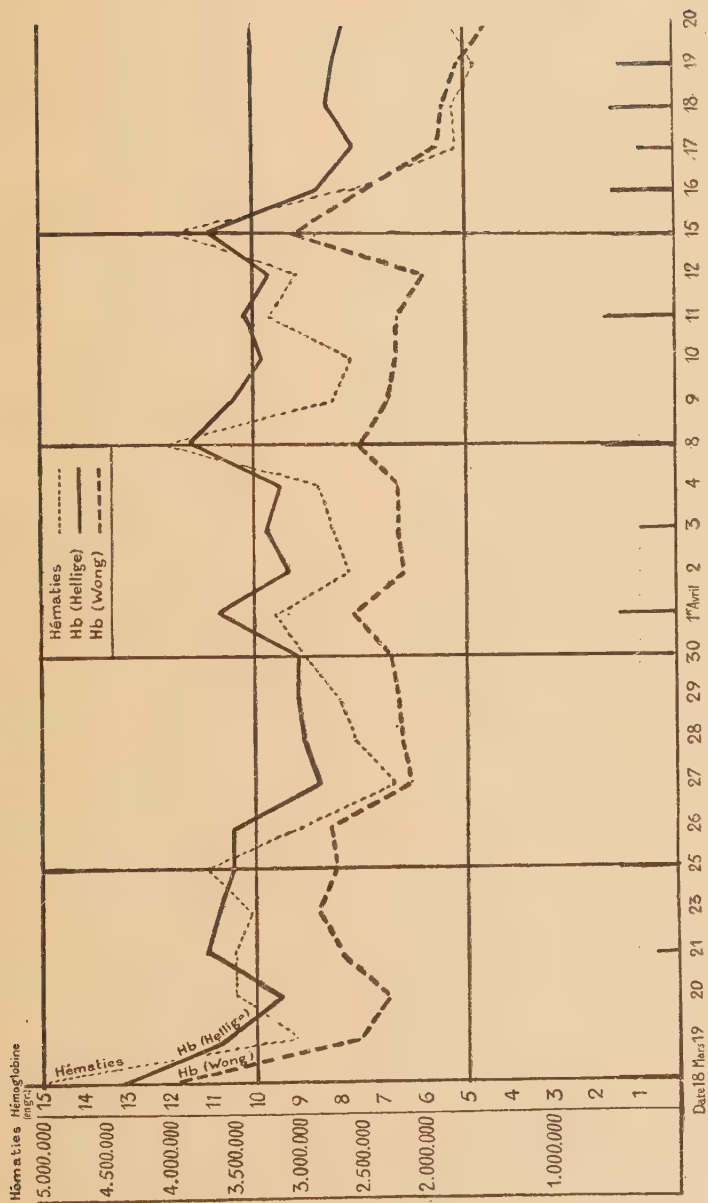
LAPIN n° 78.



LAPIN n° 76 (femelle; poids : 3 kg. 400).

	HÉMATIES	LEUCO- CYTES	HELLIGE HÉMOGLOBINE en g.	WONG		SAIGNÉE EN cm ³
				FER en mg.	HÉMOGLOBINE en g.	
18 mars.	5 080.000	7.000	13,1	40,32	12,03	40
19 mars.	3.060 000	1.200	10,9	24,75	7,38	
20 mars.	3.540.000	8.000	9,4	23,25	6,94	
21 mars.	3.540.000	5.600	11,1	26,73	7,9	15
23 mars.	3.340.000	7.600	10,9		8,47	
25 mars.	3.700.000	13.000	10,5	27,32	8,15	
26 mars.	2.940.000	9.200	10,5	27,93	8,33	40
27 mars.	2.160.000	28.000	8,5	21,2	6,33	
28 mars.	2.560 000	16 400	8,8	21,73	6,48	
29 mars.	2.700 000	12.400	9	21,90	6,53	
30 mars.	2.960 000	14.400	9	22,42	6,69	
1 ^{er} avril.	3.140.000	7.000	10,70	25,77	7,69	40
2 avril.	2.600 000	10.800	9,2	21,73	6,48	
3 avril.	2.780.000	16.000	9,6	21,90	6,53	30
4 avril.	2.900.000	9.600	9,4	22,22	6,63	
8 avril.	4.000.000	10.600	11,4	25	7,5	60
9 avril.	2 780 000	9.600	10,5	22,72	6,78	
10 avril.	2.620 000	12.800	9,8	22,22	6,63	
11 avril.	3.200.000	8.400	10,1	22,42	6,69	55
12 avril.	3.020 000	9.600	9,6	20,10	6	
13 avril.	3.960.000	4.000	11,1	31,2	9,1	50
16 avril.	2.780.000	16.000	8,5	25	7,46	50
17 avril.	1.940.000	11.200	7,5	19,5	5,73	32
18 avril.	1.960.000	8.200	8,1	18,87	5,63	45
19 avril.	1.560.000	6 000	8,1	17,12	5,11	45
20 avril.	1.800.000	14.400	7,9	15,25	4,55	

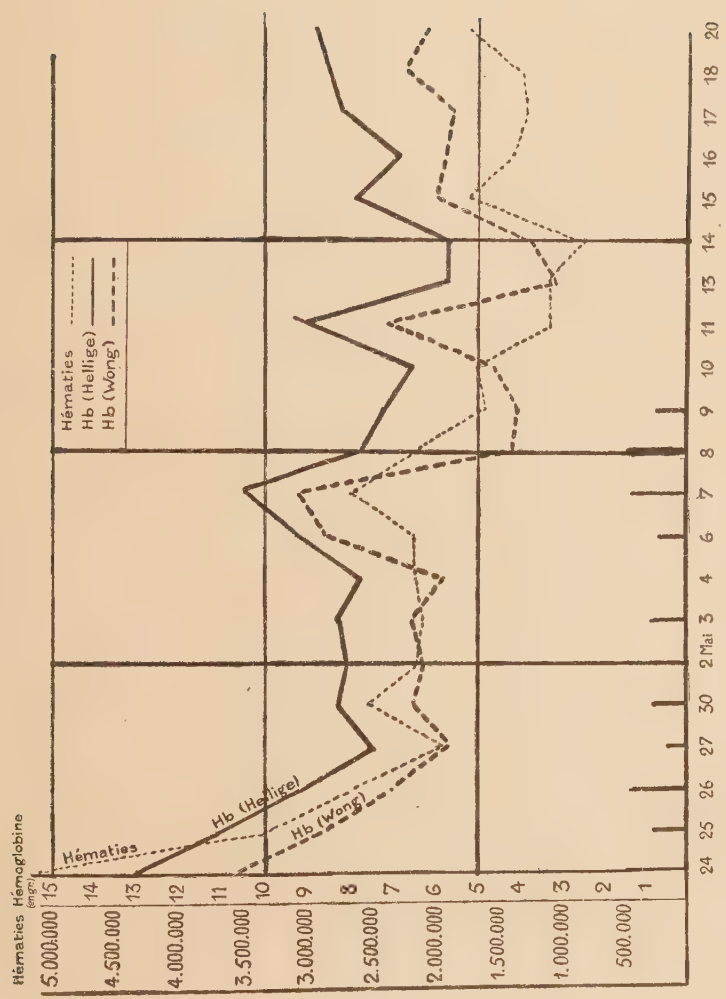
LAPIN n° 76.



LAPIN n° 71 (poids : 2 kg. 800).

	HÉMATIES	LEUCO- CYTES	HELLIGE HÉMOGLOBINE en g.	WONG		SAIGNÉE EN cm ³
				FER en mg.	HÉMOGLOBINE en g.	
23 avril.	5.320.000	3.200	13,1	35,75	10,67	45
25 avril.	3.260.000	7.200	10,9	29	8,66	25
26 avril.	2.740.000	25.000	9,2	22,72	6,7	30
27 avril.	1.680.000	8.000	7,5	17,85	5,32	15
30 avril.	2.530.000	5.200	8,3	21,90	6,53	25
2 mai..	2.080.000	4.400	8,1	21,2	6,33	
3 mai..	2.000.000	4.400	8,3	21,90	6,53	25
4 mai..	2.080.000	5.200	7,7	19,20	5,74	
6 mai..	2.060.000	5.200	9,2	29,07	8,67	20
7 mai..	2.720.000	10.400	10,5	24,39	7,28	33
8 mai..	2.020.000	8.000	7,7	13,88	4,17	40
9 mai..	1.560.000	6.800	7,2	13,90	4,15	20
10 mai..	1.580.000	16.800	6,7	15,62	4,66	
11 mai..	1.120.000	6.000	9	27,77	8,2	Injection de 2 cm ³ de sol. de phényl- hydrazine.
13 mai..	1.100.000	5.200	5,7	10,98	3,27	
14 mai..	940.000	4.000	5,7	12,93	3,85	
15 mai..	1.730.000	20.800	7,9	20,25	6,04	Injection de 2 cm ³ de sol. de phényl- hydrazine.
16 mai..	1.300.000	6.000	6,8	19,72	5,88	
17 mai..	1.200.000	4.000	8,1	19	5,67	
18 mai..	1.280.000	3.600	8,5	22,75	6,79	
20 mai..	1.600.000	2.800	8,8	20,81	6,21	

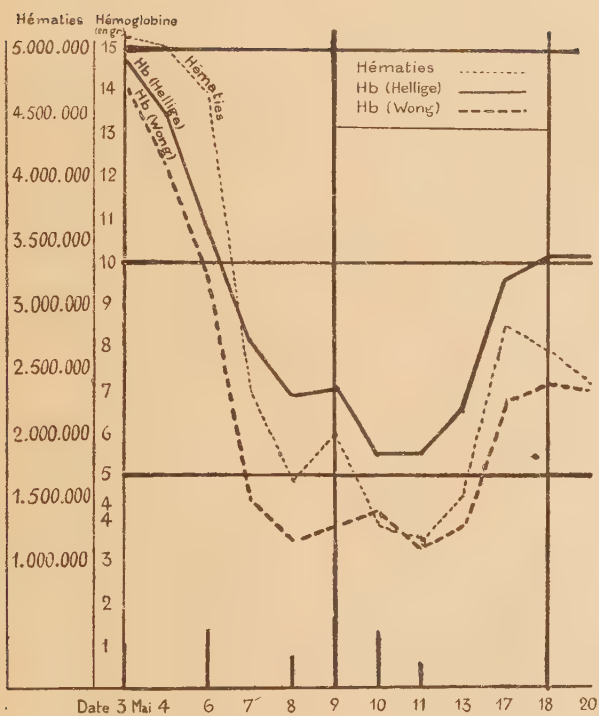
LAPIN n° 71.



LAPIN n° 66.

	HEMATIES	LEUCOCYTES	HELLIGE HÉMOGLOBINE en g.	WONG		SAIGNÉE EN cm ³
				FER en mg.	HÉMOGLOBINE en g.	
3 mai..	5.160.000	8.200	14,6	47,61	14,21	25
4 mai..	5.000.000	2.800	13,5	41,66	12,43	
6 mai..	4.720.000	13.200	10,9	32,05	9,56	45
7 mai..	2.280 000	9.200	8,1	14,70	4,39	
8 mai..	1.420.000	5.200	6,8	11,70	3,49	20
9 mai..	2.040.000	17.200	7	12,73	3,80	47
10 mai..	1.260.000	16.800	5,5	13,88	4,14	30
11 mai..	1.140.000	8.800	5,5	11,36	3,39	15
						Injection de 2 cm ³ de sol. de phényl- hydrazine.
13 mai..	1.420 000	7.600	6,6	12,88	3,84	
17 mai..	2.960 000	7.600	9,6	22	6,56	
18 mai..	2.620.000	8.000	10,1	23,5	7,01	
20 mai..	2.320.000	4.800	10,1	23,80	7,1	

LAPIN n° 66.



II. — *Anémies cliniques.*

M. G... Sujet normal.

Globules rouges, 5.020.000.

Hellige : hémoglobine, 17 g.

Wong : fer 49 mg. 50; hémoglobine, 14 g. 7

M. B... Sujet normal.

Globules rouges, 5.040.000.

Hellige : hémoglobine, 17 g. 2.

Wong : fer, 48 mg. 07; hémoglobine, 14 g. 30.

M. L... Splénomégalie.

Hématies, 3.020.000.

Hellige : hémoglobine, 17 g. 2.

Wong : fer, 50 mg.; hémoglobine, 15 g.

2 jours après :

Hématies, 4.300.000.

Hellige : hémoglobine, 17 g. 2.

Wong : fer, 48 mg. 54; hémoglobine, 14 g. 5.

6 jours après :

Hématies, 4.880.000.

Hellige : hémoglobine, 17 g.

Wong : fer, 50 mg.; hémoglobine, 15 gr.

M. C... Malariathérapie, paralysie générale.

Hématies, 4.100.000.

Hellige : hémoglobine, 14 g. 6.

Wong : fer, 35 mg. 17; hémoglobine, 10 g. 5.

Mme G...

Hématies, 1.700.000.

Hellige : hémoglobine, 8 g. 3.

Wong : fer, 26 mg. 45; hémoglobine, 7 g. 89

Mme R... Anémie pseudo-leucémique.

Hématies, 1.200.000.

Hellige : hémoglobine, 3 g. 8.

Wong : fer, 12 mg. 5; hémoglobine, 3 g. 73.

M. P... Leucémie myéloïde.

Hématies, 2.480.000.

Hellige : hémoglobine, 12 g. 7.

Wong : fer, 32 mg. 89; hémoglobine, 9 g. 81.

M. X... Anémie aplastique.

4 janvier 1935 :

Hématies, 670.000.

Hellige : hémoglobine, 4 g. 4.

Wong : fer, 10 mg.; hémoglobine, 3 g. 33.

21 janvier 1935 :

Hématies, 490.000.

Hellige : hémoglobine, 4 g. 2.

Wong : fer, 11 mg. 9; hémoglobine, 3 g. 57.

25 janvier 1935 :

Hématies, 520.000.

Hellige : hémoglobine, 4 g. 6.

Wong : fer, 12 mg. 5; hémoglobine, 3 g. 75

29 janvier 1935 :

Hématies, 480.000.

Hellige : hémoglobine, 4 g. 4.

Wong : fer, 11 mg. 5; hémoglobine, 3 g. 45.

31 janvier 1935 .

Hématies, 392.000.

Hellige : hémoglobine, 4 g. 2.

Wong : fer, 11 mg. 5; hémoglobine, 3 g. 45.

La première constatation, d'ordre général, que nous faisons en étudiant ces graphiques, est que toujours la courbe donnée par le Hellige chemine au-dessus de celle de Wong.

Cette dissociation existe à l'état normal comme à l'état pathologique aussi bien chez l'homme que chez le lapin.

La conclusion que l'on peut tirer est qu'on aura intérêt,

quand on voudra utiliser la méthode d'Autenrieth-Hellige, à bâtir soi-même son échelle d'après la teneur en fer d'individus ou d'animaux normaux.

Dans tous les résultats obtenus, nous constatons des divergences manifestes entre les chiffres fournis par la méthode d'Autenrieth-Hellige et celle au fer de Wong. Ces divergences semblent d'autant plus accentuées que l'anémie est plus profonde, et en cela nous sommes en concordance avec Fontès et Thivolle, mais, par contre, nous n'avons pas trouvé comme eux des écarts aussi considérables.

Ces anomalies ne sont cependant pas constantes, et certains passages de nos courbes présentent une correspondance presque régulière, sans qu'on puisse d'ailleurs expliquer pourquoi.

De tout ceci nous concluons que les méthodes colorimétriques ne peuvent être utilisées quand on veut des résultats précis du taux de l'hémoglobine.

Dans les anémies marquées (2.000.000 de globules et au-dessous) tant expérimentales que cliniques, l'emploi de ces méthodes ferait classer comme hyperchromes des anémies que la méthode au fer montre iso ou hypochromes (lapins, 66, 71).

Quand un résultat approximatif sera suffisant, nous les choisirons, car elles ont l'avantage d'être simples, rapides. De toutes, nous préférons la méthode d'Autenrieth-Hellige, qui utilise un appareil rendant les lectures faciles.

Lorsque nous voudrions avoir un taux exact de l'hémoglobine, nos résultats, ainsi que ceux de Fontès et Thivolle, montrent la nécessité de recourir à la méthode de dosage du fer, et en particulier lorsqu'on voudra établir une classification des anémies.

CONCLUSIONS

Le taux de l'hémoglobine est une connaissance capitale dans les anémies; il permet de rechercher la valeur globulaire qui, dans nos connaissances actuelles, est indispensable pour le diagnostic, le pronostic et le traitement.

Nous nous sommes proposé de doser, par des méthodes cliniques, l'hémoglobine dans les anémies expérimentales et pathologiques et d'en comparer les résultats avec ceux trouvés par Fontès et Thivolle.

Nous avons passé en revue les principales méthodes de dosage; nous remarquons en premier lieu que le taux de l'hémoglobine normale n'est pas le même pour tous les auteurs.

Il s'ensuit des variations dans les résultats suivant la méthode employée.

Une première condition serait donc une entente sur le taux exact de l'hémoglobine normale.

En deuxième lieu, ce qui nous a frappé, c'est le nombre important des méthodes mises à notre disposition. On pourrait croire alors que le dosage de l'hémoglobine est une chose facile à réaliser. Il n'en est rien, et beaucoup de celles-ci doivent être abandonnées, soit qu'elles ne répondent pas aux conditions cliniques, soit qu'elles donnent des résultats erronés.

En définitive, nous nous sommes arrêté aux méthodes d'Autenrieth-Hellige et de Wong au fer, que nous avons préférées à celles de Sahli d'une part, de Fleury et Marque d'autre part, employées par Fontès et Thivolle.

Nous avons décrit le principe et la technique de nos méthodes, quels en étaient les avantages et les inconvénients, les raisons qui nous les ont fait préférer à celles de Fontès et Thivolle. (La méthode de Sahli a été critiquée et donne des erreurs grossières, principalement dans les anémies; celle de Fleury et Marque ne semble pas répondre aux conditions cliniques.) Nous avons énuméré les résultats que nous avons trouvés dans les anémies expérimentales et cliniques par les deux méthodes, et nous les avons fait suivre des courbes correspondantes.

1° L'échelle d'Autenrieth est toujours supérieure à celle du fer, d'où intérêt à bâtir son échelle soi-même;

2° Les chiffres du Hellige et du Wong sont divergents, et cette divergence est souvent d'autant plus prononcée que l'anémie est plus considérable;

3° Nos résultats sont en conformité de vue avec ceux de Fontès et Thivolle et montrent la nécessité de recourir à la méthode de dosage du fer pour la classification des anémies.

VU : *Le Doyen,*

PIERRE MAURIAC.

VU, BON A IMPRIMER :

Le Président,

PIERRE MAURIAC.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Bordeaux, le 7 décembre 1935.

Le Recteur de l'Académie,

A. TERRACHER.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAIR (G.). — *Proc. Roy. Soc., A.*, 108, 628, 1923.
- AGASSE-LAFONT. — Les applications pratiques du laboratoire à la clinique. 4^e éd., 1929, Vigot Frères.
- BARCROFT (J.). — Le groupement protéique dans l'hémoglobine *Bull. soc. chim. biol.*, 10, n° 2, 1928.
- BARCROFT (J.) et HALDANE (J. S.). — A method of estimating the oxygen and carbon acid in small quantities of blood. *Journ. of physiol.*, XXVIII, 232, 1902.
- BARCROFT (J.). et MORAWITZ. — Über die ferricyanidmethode zur blutgasbestimmung für klinische zwecke-deutsch. *Arch. f. klin. med.*, XCIII, 223, 1908.
- BERCZELLER (L.). — Über die colorimetrische bestimmung des hämoglobins als säurehämatin. *Biochem. zeit.*, 87, 23, 1928.
- BERNARD-TEITEL. — Sur une technique simple permettant d'obtenir des cristaux d'hémoglobine humaine. Soc. roumaine d'hématologie 23 juin 1933. *Le Sang*, n° 1, 1934.
- BERMANN (L.). — A rapid method for the determination of iron in small quantities of blood. *J. biol. chem.*, 35, 231, 1918.
- BICART (P.). — Contribution à l'étude de l'hémoglobine au cours des anémies pathologiques et expérimentales. Thèse doctorat médecine, Strasbourg, 1929.
- BROWN (A. L.). — A new quantitative method for the détermination of iron in the blood. *J. am. chem. Soc.*, 44, 423, 1922.
- BROWN (G. O.) et BRIGGS (A. P.). — Hémoglobin and blood relations as déterminated, by iron and oxygen capacity methods. *J. of laboratory and clinical med.*, 19, p. 886.

- BURN (J. H.). — The oxygen capacity of blood considèred in relation to the concentration of the hemoglobin. *J. of. physiol.*, XLV, 482, 1903.
- BROWN et HILL. — The physical chemistry of hemoglobin in blood (*Arch. néerl. de physiol.*, La Haye, 1922, VII, p. 174.
- BURGI. — Dosage de l'hémoglobine. *Schweizerische med. Wochenschrift*, n° 28, 15 juill. 1933.
- BURGI. — Valeur de l'hémoglobine de la population des environs de Zurich; technique du dosage de l'hémoglobine. *Schweiz. med. Wochen.*, n° 27, 8 juill. 1933.
- CAMIS. — Ricerche chim. cofisiche sull'emoglobina con particolare riguardo alla dottrina dell'aggregazione molecolare. *Hæmatologica Napoli*, 1921, 11, p. 149.
- CANTARRUTI. — Recherches physiologiques et pathologiques sur l'hémoglobine. *Minerva medica*, n° 51, 22 déc. 1931.
- CARRACIDO (J.). — Formacion natural de la hemoglobina. *Rev. espe. med.*, Madrid, IX, p. 412, 1906.
- CASTEX (U. R.), SCHTEIGART (M.) et POLETTI (R.). — Hemoglobina anemia aguda a regeneracion eritroblastica intensa. *Rev. spc. de med. inter.; J. soc. de phisiol.*, 7, 664, 670, oct.-déc. 1931.
- CULLEN. — Représentation graphique du rapport de l'hémoglobine au nombre de globules rouges. *Journ. Am. Med. Assoc.*, n° 13, 26 mars 1932.
- COHEN et SMITH. — The colorimetric détermination of hemoglobin. A pratical procedure. *J. biol. chem.*, 1919, 39, 489.
- DARE. — A new hemoglobinometer for the examination of undiluted blood. *Philadelphia med. J.*, 1900, 6, 557.
- DUCOU (P.). — Considération sur la méthémoglobine. Son dosage dans le sang. Thèse Paris, 1925.
- DREYER (G.), BAZETT (H. C.) and PIERCE (H. F.). — Diurnal variations in the hemoglobin content of the blood. *Lancet*, London, 2, 558, 1920.
- EMERSON (C. P.). — Clinical diagnosis, fourth ed., Philadelphie. J. P. Lippincott. C°, 513 p.

- FELTON (L. D.). — A substitute for acid hematin as the standard in Sahli's hemoglobinimeter. *John Hopkins hosp. Bull.*, 34, 357, 1923.
- FONTÈS et THIVOLLE. — Sur le dosage exact de l'hémoglobine dans le sang normal et anémique. Soc. franç. d'hématol., séance du 2 déc. 1931. *Le Sang*, 6, 207, 1932.
- La molybdo-manganimétrie et ses applications (2^e partie : Microdosage du fer). Application au dosage du fer dans le sang. *Soc. chim. biol.*, 5, 325, 340, 792, 1923.
- Sur la teneur du sérum en fer non hémoglobinique et sur sa diminution au cours de l'anémie expérimentale (*Soc. biol.*, 93, 687, 1925).
- FITZ, HUGLE (T. J.), ROBERTSOS et DRABKIN (D. L.). — Hemoglobine production evolution of therapeutic agents in anemia due to milk diets based on study of blood and bone, manow, of rats from birth to maturity. *Journ. biol. chem.*, déc., p. 617, 1933.
- FLEURY et MARQUE. — Le dosage du fer sanguin par molybdomanganimétrie; nouvelle technique *bull. Soc. chim. biol.*, 1929, 11, 1925.
- GOWERS (W. R.). — Apparatus for the clinical estimation of the haemoglobin in the blood. *Trans. clin. Soc. London. Lancet*, 2; 882, 1878.
- GRAM (H. C.). — Sedimentation of the blood corpuscles in various internal diseases and results of correction of this value for variations of hemoglobin percentage. *Acta. med. Scandin.*, p. 242, 1929.
- HADEN (R. L.). — The normal hemoglobin standard. *Jour. am. med. ass.*, 79, 1496-1497, 1922.
- HADEN (R. L.). — A new hemoglobinometer. *Journ. lab. and clin. méd.*, 16, 68, 72, 1930.
- HAESSLER et NEWCOMER (H.). — A clinical hemoglobinometer. *Arch. int. med.*, 17, 806, 1916.
- HALDANE (J.). — The colorimetric determination of hemoglobin. *J. Physiol.*, 26, 497, 1900-1901.
- The ferricyanid method of determining the oxygen capacity of blood. *Journ. of physiol.*, XXV, 295, 1900.

- HALDANE (J. S.) and SMITH (J. L.). — The mass and oxygen capacity of the blood in man. *J. Physiol.*, 25, 331, 1899-1900.
- HENRIQUEZ (V.) et ROCHE (A.). — Sur le fer du sérum de diverses espèces animales. *Bull. Soc. chim. biol.*, 9, 501, 504, 1927.
- HASKINS (H. D.). — A new permanent standard for Sahli's hemoglobinometer. *J. biol. chem.*, 57, 111, 1923.
- HALLION et BORRIEN (H.). — Sur le dosage chimique de l'hémoglobine du sang à l'aide d'une échelle colorimétrique. *Revue pratique de biologie appliquée*, mars 1934.
- HOPPE-SAYLER (F.). — Verbesserte methode der colorimetrischen Bestimmung des blutfarbstoffgehaltes in blut und in anderen flussigkeiten. *Z. Physiol. Chem.*, 16, 505, 1892.
- HOWARD (F. H.). — The determination of the refractivity of hemoglobin in solution. *J. biol. chem.*, 41, 537, 1920.
- JACOBSON (V.). — A new standard solution for Sahli's modification of Gower's hemoglobinometer. *J. am. med. ass.*, 73, 128, 1919.
- JONG (J. J. de). — Le taux de l'hémoglobine du sang et le volume des globules rouges par rapport à la signification de la valeur globulaire. *Presse méd.*, 1^{er} oct. 1924.
- KUSCHNER. — Rapport globule-plasma et dosage de l'hémoglobine par concentration globulaire. *Arch. of pathology*, n° 6, juin 1933.
- MULLER. — Teneur en hémoglobine du sérum normal. *Klin. Wochen.*, n° 32, 6 août 1932, p. 1352.
- NEWCOMER (H. S.). — Absorption spectral of acid hematin, oxyhemoglobin, and carbonmonoxide hemoglobin. A new hemoglobinometer. *J. biol. chem.*, 37, 465, 1919.
- NEWCOMER (H. S.). — A new optical instrument for the determination of hemoglobin. *J. biol. chem.*, 55, 569, 1923.
- NICLOUX (M.). — Appareil pour l'extraction de l'oxyde de carbone du sang. *Soc. biol.*, 75, 57, 1914.
- NICLOUX. — Eudiomètre pour de petites quantités de gaz. Application. *Soc. biol.*, 85, 118, 1921.
- NICLOUX (M.) et ROCHE (J.). — Dosage de l'oxygène dans le sang. *C. R. Soc. biol.*, p. 1893, 1925.

- OSGOOD (E. E.). — Hemoglobin, color index, saturation index and volume index standards; redetermination based on the findings in 137 healthy young men. *Arch. int. med.*, 37, 688-706, 1926.
- Tables for calculation of color index, volume index and saturation index based on recently determined standards. *Journ. lab. and clin. med.*, 12, 889-906, 1927.
- OSGOOD (E. E.) and HASKINS (D. D.). — Relation between cell count, cell volume and hemoglobin content of venous blood in normal young women. *Arch. Int. med.*, 39, 643-855, 1927.
- OSGOOD (E. E.), HASKINS and TROTMAN (F. T.). — A simplification of the Osgood-Haskins hemoglobin method. *Journ. lab. and clin. med.*, 16, 482-486, 1931.
- OSGOOD (E. E.), HASKINS (H. D.). — A new permanent standard for estimation of hemoglobin by the acid hematin method. *J. biol. chem.*, 57, 107, 1923.
- PALMER (W. W.). — The colorimetric determination of hemoglobin. *J. biol. chem.*, 33, 119, 1918.
- PAGET et LAMBLIN (J.). — Recherches sur le fer et l'hémoglobine du sang. *Journ. des sc. méd. de Lille*, n° 22, 51^e année, 28 mai 1933.
- PETERS (R. A.). — Chemical nature of specific oxygen capacity in hemoglobin. *J. of Physiol.*, 44, 131, 1912.
- PRICES-JONES. — The concentration of hemoglobin in normal human blood. *J. path. and bact.*, 34, 779-787, 1931.
- REICHERT (C.). — Das haemometer nach Professor Ed. Fleischl von Marxow. Wein, 1889.
- ROBSCHÉIT (F. S.). — A comparative study of hemoglobin determination by various methods. *J. biol. chem.*, 81, 209, 1930.
- SACHS et LÉVINE. — *Arch. int. méd.*, 52, 366.
- SAHLI (H.). — Diagnostic methods-Translation of Ed. 4. Philadelphia, 1905.
- SAYERSR (R.) and YANT (W. P.). — Pyrotannic acid method for determination of carbon monoxide in blood and air. U. S. Bureau of Mines, 1925, Technical paper 373, Washington D. C. Analyst, 51, 99, 1926.

- SZEGOE et PASSONI (B.). — *Giorn. Chem. Int. Applicato*, 1933, 15, 281.
- SANFORD (A. H.) and SHEARD (C.). — Determination of hemoglobin with photoélectrometer. *J. lab. and clin.*, 15, 483-489, févr. 1930.
- SCHULTEN. — Dosage de l'hémoglobine. *Munch. med. Wochen.*, n° 26, 30 juin 1933.
- SENTY (E. G.). — A comparative study of various methods of hemoglobin determinations *J. lab. and clin. med.*, 8, 591, 1923.
- STADIE (W. C.). — A method for the determination of methemoglobin in blood. *J. biol. chem.*, 41, 237, 1920.
- STODDARD (J. L.) and ADAIR (G. S.). — The refractometric determination of hemoglobin. *J. biol. chem.*, 75, 437, 1923.
- TERRILL (E. H.). — On the colorimetric determination of hemoglobin with special reference to the production of stable standards *J. biol. chem.*, 53, 179, 1922.
- THIEL. — Nouvel hémoglobinomètre sans solution d'hémoglobine étalon. *Munch. Med. Wochen.*, an LXXX, n° 13, 31 mars 1933, p. 499.
- VAN SLYKE (D. D.) and HILLER. — Gasometric determination of hemoglobin by the carbon monoxide capacity method. *J. biol. chem.*, 78, 807, 1928.
- Gasometric control of standards for the Palmer hemoglobin method. *J. biol. chem.*, 84, 211, 1929.
- VAN SLYKE (D. D.) and STADIE (W. C.). — The determination of the gases in the blood. *J. biol. chem.*, 49, 1, 1921.
- WILLIAMSON (C. S.). — Influence of age and sex on hemoglobin. A spectrometric analysis of nine hundred and nineteen cases. *Arch. int. méd.*, 18, 503, 1916.
- WINTROBE (M. M.). — Blood of normal young women residing in a subtropical climate. *Arch. int. med.*, 45, 287-301, 1930.
- WINTROBE (M. M.). — Hemoglobin standards in normal men. *Proc. Soc. exp. biol. and med.*, 26, 848-851, 1929.
- WINTROBE and MULLER (M. W.). — Normal blood determinations in the south. *Arch. int. med.*, 43, 96-113, 1929.
- WOLTER (O.). — Über das harneisen. I. die bestimmung des eisens im Harm. *Biochem. Z.*, 24, 108, 1910.

Wong (S. Y.). — Colorimetric determination of iron and hemoglobin in blood II. *J. biol. chem.*, 77, 409, 1928.

Wu (H.). — Etudes sur l'hémoglobine : les avantages des solutions acides pour les méthodes colorimétriques de détermination de l'hémoglobine. *J. biochem. (Japan)*, 2, 173, 1922.

— An ultra-micro-method for the determination of hemoglobin as a peroxidase. *J. biochem. (Japan)*, 2, 189, 1922.

